

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560233

研究課題名(和文)ソノインジェクション法の実現に向けた光ピンセットの改良と細胞微小培養容器の開発

研究課題名(英文)Improvement of optical tweezers and development of micro cell culture wells for realization of sono-injection technique

研究代表者

工藤 信樹 (Kudo, Nobuki)

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：30271638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小気泡を付着させた細胞への超音波照射により細胞内に遺伝子や薬剤を導入する手法に関する実験的検討に必要となる2つの要素技術について検討した。気泡による導入はその付着位置に起きるため、気泡の大きさや位置の制御により導入を制御することができる。そこで本検討では、気泡捕捉用光ピンセットの捕捉力を改善し、従来困難であった細胞核上への気泡の移動を実現した。また、細胞膜の張力が低く損傷細胞の修復力が高い生体内に近い状態での実験を実現することを目的に直径100ミクロン程度の微小細胞培養ウエルを開発した。さらに、これを用いた細胞内導入実験を行い、容器の有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：The studies investigated the two elemental technologies that are essential for experimental studies on gene and drug transduction by exposure of cells with attached microbubbles to ultrasound. Since the transduction occurs at the position of the attached bubbles, its efficiency can be controlled by the size and position of the attached bubbles. Therefore, in this study, conventional optical tweezers were improved to increase bubble trapping force to move a bubble on a cell nucleus. Small cell culture wells of around 100 microns were also fabricated to maintain cultured cells under in vivo-like conditions that have high cell membrane repairability. Transduction experiments were carried out using the fabricated wells, indicating that the wells are useful for basic studies on gene and drug delivery by ultrasound exposure.

研究分野：医用システム

キーワード：マイクロインジェクション 超音波 微小気泡 光ピンセット マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

1つの細胞や胚内に確実に遺伝子を導入する手法としてマイクロインジェクション法があり、遺伝子改変動物の作成などに盛んに応用されている。しかし、細胞に与える損傷が大きく、小型の体細胞への導入成功率は低い。一方、多数の細胞に一度に遺伝子を導入する方法として、無害化したウイルスを用いるウイルス法と、物理的刺激を用いるエレクトロポレーション法やソノポレーション法がある。ウイルス法は導入効率が高いものの、遺伝子異常を誘導する可能性が否定できない。一方、物理的手法はウイルス法に比べて導入効率が低く一過性の遺伝子発現しか得られないが、安全性の高さが注目を集めている。しかし、導入する細胞や導入部位を制御できないこと、導入効率が低いことが大きな課題となっている。

研究代表者は、直径1ミクロン程度の微小気泡が付着した細胞にパルス超音波を照射すると、その部位の細胞膜に微小穿孔が生じることを世界に先駆けて報告し (Kudo et al., *Biophys. J.* 96:4866-4876), これを用いれば、細胞の任意の場所に安定的に遺伝子導入が実現できる可能性があることを発想した。しかし、その実現には、目標とする位置に安定にマイクロジェットを発生させる技術と、損傷した細胞膜を速やかな修復に導く技術を開発する必要があった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の3点の検討を行うことを目的とした。

- (1) 我々が以前開発した微小気泡捕捉用光ピンセットを改良し、細胞や培養容器の形状も考慮して決定した最適な位置に必要な大きさの微小気泡を3次元捕捉する技術を実現する。
- (2) 細胞の膜張力が低下すると、膜損傷の修復能が向上することが報告されている。しかし、これまで我々が *in vitro* 実験で用いてきた条件は、生体内細胞よりも膜張力が高い条件であった。そこで、生体内の細胞に近い低い膜張力条件で細胞を培養できる微小培養容器をマイクロ流路技術を応用して開発する。
- (3) 上記2つのツールを用いて微小気泡や超音波の照射条件を様々に変えてインジェクションを行い、細胞膜の損傷と修復が安定して生じさせることの基本的な見通しを得る。

3. 研究の方法

(1) 光ピンセットの捕捉力向上

波長1,064 nmのレーザ (光出力2 W, YLM-2-1064-LP, IPG LASER) を用いて微小気泡捕捉用光ピンセットを作成した。拡大した光ビームを反射型空間光変調器 (LCOS-SLM, X10468-03, 浜松ホトニクス) の液晶部に入射することにより液晶に表示したホログラムに

より位相変調を行ない、ドーナツビームを形成した。光ビームは、倒立型顕微鏡内に設置したダイクロイックミラーから顕微鏡の光路に導入し、観察用対物レンズの焦点位置にドーナツビームを発生した。ドーナツ型ビームとしては従来のLGビーム (Laguerre-Gaussian beam) に代えてベッセルビームを使用し、捕捉力強化のためにパラメータの最適化を行った。

(2) 細胞膜張力と損傷修復力の関連

カバーガラスに細胞を播種して72時間程度静置すると、細胞の一部のみがカバーガラスに接着している球形の細胞と、仮足を伸展して広がり細胞全体が接着している紡錘形の細胞が、同一のカバーガラス上に混在する状態を実現できる。両細胞とも播種前の細胞の大きさには違いがないため、紡錘形細胞の方が比較的大きな膜張力が働いていると考えられる。そこで、これら形状の異なる細胞を選択し、光ピンセットを用いて観察対象とする細胞のみに気泡を一つ接触させた状態でソノポレーションを行なった。気泡の大きさは直径2-5 μmの範囲とし、各試行で細胞と気泡の相対位置関係がほぼ同一となるよう気泡位置を制御した。気泡としてはバブルリポソームを用い、光ピンセットで気泡位置を標的とする細胞の所望の位置に捕捉した状態で最大負圧0.5 MPa、波数3波のパルス超音波を1回のみ照射した。

細胞損傷の程度の評価には、膜損傷発生時のみ細胞内に入り赤い蛍光を発生する propidium iodide (PI) を用いた。超音波照射直後における細胞内へのPI導入量は、細胞膜に生じた損傷の大きさに比例すると考えられる。そこで、照射直後に取得した蛍光像から細胞内の蛍光輝度値を測定し、損傷の大きさを表す指標とした。さらにこの値と照射5分後の修復結果を対応付けることで各細胞形状条件における修復可能な損傷の大きさを評価した。

(3) 培養ウェル基板の作成

培養ウェルの作製にはフォトリソグラフィ技術を用いた。ネガ型の厚膜フォトレジストであるSU-8 3050 (日本化薬) をカバーガラス上にスピコートし、フォトマスクを用いて露光した。コーティングにはスピコーター (MS-A 100, ミカサ) を、露光にはマスクアライナー (MA-6, ズース・マイクロテック) を用いた。

2種類のフォトマスクを作成した。マスクⅠは直径15-50 μm (5 μm step) の円形を15個並べたものを1行とし、それを16行並べた16×15個の行列パターンを一区画とした。マスクⅡは直径100 μmの円形を8個並べたものを1行とし、それを9行並べた9×8個の行列パターンを一区画とし、16区画を1つのマスク上に作成した。

(4) ウェルでの細胞培養

培養ウェルを作製したカバーガラスを35 mmシャーレ内に置き、紫外線による滅菌を20分間行なった。その後、 1×10^5 個/mlの細胞懸濁液を2 mL入れ、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、湿度100%下で3日間培養した。細胞としてはヒト前立腺がん細胞(PC-3)を、培養液は10%のウシ胎児血清を加えたRPMI1640培養液を用いた。

(5) 伸展制御の評価

細胞を上記の高濃度条件で播種し、ウェル内が細胞で満たされたものを観察対象とした。細胞は直径100 μm のウェル(マスクII)内で培養し、微分干渉像を取得した。Image Jを用いて微分干渉像からウェル内の細胞数をカウントし、各細胞の接着面積を測定した。同様の処理を計37個の培養ウェルに対して行ない、ウェル内細胞の個数と接着面積の関連を調べた。

(6) ソノポレーション

ウェル内の細胞を対象にソノポレーション実験を行った。倒立型顕微鏡を用いて、細胞の微分干渉像と蛍光像を撮影した。顕微鏡のステージ上に置いた水槽の底面に穴を開け、その上面に培養面を下向きにした細胞試料を、下面には通常のカバーガラスを張り付けることで観察チャンバを構成した。チャンバ溶液にはPIと直径約2 μm 程度の微小気泡(バブルリポソーム)を添加したHanks' balanced salt solution (HBSS)を用いた。微小気泡が浮力により細胞に接着するのを待ち、集束型振動子(中心周波数1 MHz)を用いて最大負圧0.5 MPa、波数3波のパルス超音波を1回照射した。超音波照射に伴う細胞の変化を15分間に渡りタイムラプス観察した。

4. 研究成果

(1) 気泡捕捉力が向上した

改善した光ピンセットに採用したベッセルビームの捕捉力は、従来のLGビームに比べて最大2.4倍向上した。その効果を確認するために、細胞の核上に気泡を移動する実験を行った。一般に、カバーガラス上に培養した細胞は核の部分が他の部分に比べ厚く(10 μm

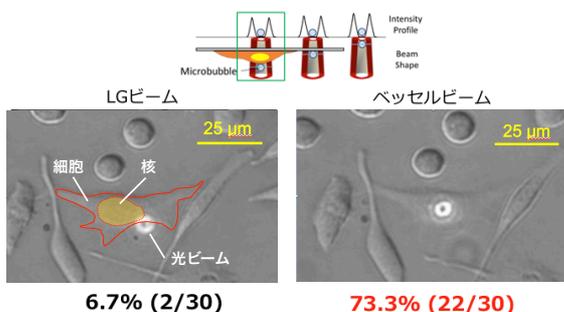


図1 光ピンセットにより捕捉した微小気泡の細胞核上へ移動。(a) LGビームでの捕捉が外れた点。(b)ベッセルビームで核上に移動した微小気泡。

m程度)、浮力に逆らって核上まで気泡を移動することは難しい。そこで、気泡を核上に移動できる割合を同じ細胞と気泡を用いて比較した(図1)。その結果、核上への移動ができた割合は、LGビームで6.7%、ベッセルビームでは73%であり、細胞上の任意の位置でソノポレーションを誘導するのに必要な捕捉力が実現されていると考えられた。しかし、移動可能な気泡は、細胞直下で浮遊している気泡のみであり、細胞に接着した気泡を動かすことや、気泡を光ピンセットのビーム方向に制御することはできなかった。

(2) 細胞膜張力が低いと損傷修復力が高い

細胞形状の違いによって膜修復能に差が現れた一例を図2に示す。球形細胞と紡錘形細胞に気泡を接触させた状態(a)、(b)で超音波を照射すると、気泡の周辺部位に損傷が生じ、(c)、(d)照射10秒後に撮影した蛍光像からPIの導入が確認できる。この時点で測定した細胞内の蛍光輝度の積分値は、球形細胞は 2.2×10^4 、紡錘形細胞は 2.2×10^4 であり、両細胞に生じた損傷は同程度であることがわかる。ところが(e)、(f)照射5分後の輝度値は、球形細胞は 1.1×10^4 、紡錘形細胞では 9.6×10^4 であり、大きな違いが生じていた。

各形状の細胞27体に対してソノポレーションを行い、膜修復能を評価した結果を図3に示す。黒点はネクローシスに至った細胞、白点が修復に成功した細胞を示す。

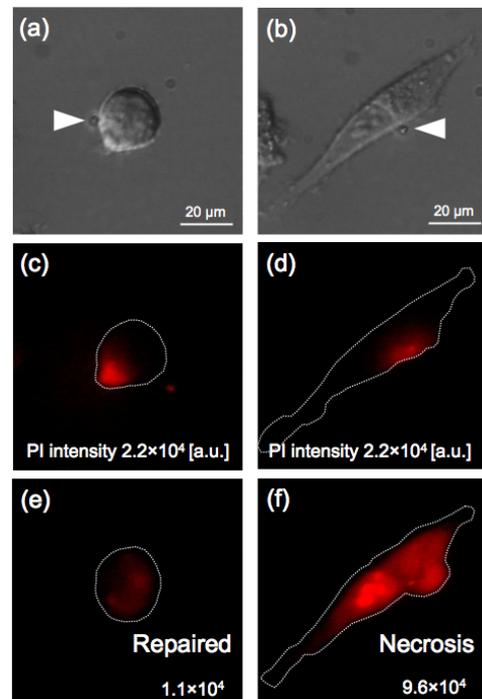


図2 修復に成功した球形細胞(左)と失敗した紡錘形細胞の観察例。(a)、(b)超音波照射前の微分干渉像。(c)、(d)照射直後(-10 s)の蛍光像。(e)、(f)照射5分後の蛍光像。

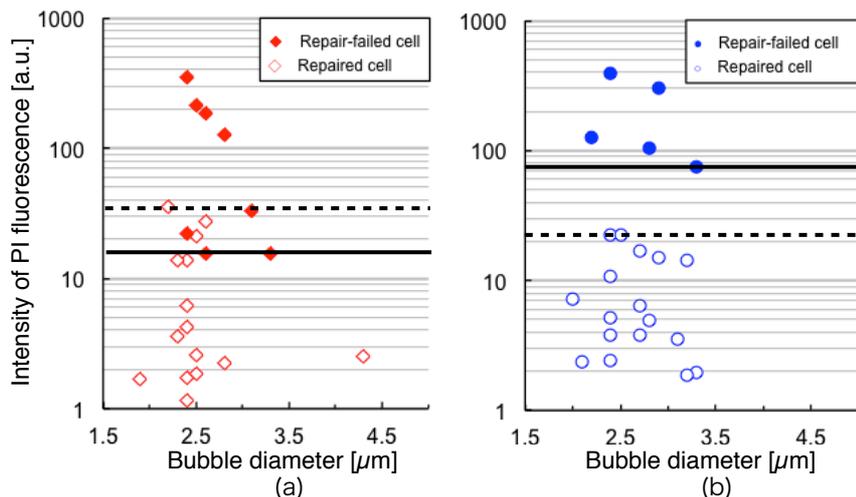


図3 PI輝度で評価した損傷の程度と修復の可否との関連。(a) 紡錘形細胞, (b) 球形細胞. ◆, ●は修復に失敗した細胞, ◇, ○は修復に成功した細胞.

また、各条件において修復可能であった最大損傷レベルを実線で、修復不能であった最小損傷レベルを点線で示した。修復可能であった最大損傷レベルを比較すると、紡錘形細胞の方が球形細胞に比べて1.5倍程度高い結果となった。しかし、修復不能であった最小損傷レベルは、紡錘形細胞の方が球形細胞に比べて5分の1に低下する結果となった。また、損傷レベルが $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ の範囲にある細胞の膜修復率は、球形細胞は94% (18体中17体)、紡錘形細胞では79% (19体中15体)であった。これらのことから、比較的膜張力の高い紡錘形細胞は、球形細胞に比べて膜修復能が低く、より小さな損傷でも修復できない蛍光にあることが確認された。

(3) 長期培養可能な培養ウェルを作成した

マスク I で作製した培養ウェルの1例を図4に示す。(a)は形状測定マイクロスコープ(VK-X, KEYENCE)を用いて観測した光学顕微鏡像、(b)は断面のプロファイルである。ウェルの深さは40 μm 程度で、ウェル内の細胞が乗り越えない程度の深さが実現されている。

作製した基板を培養液に液浸したところ、開始から16時間未滿で、SU-8層がカバーガラスから剥離した。そこで、基板にパリレンコーティングを施した結果、1週間程度連続浸漬しても剥離が起きないことを確認した。しか

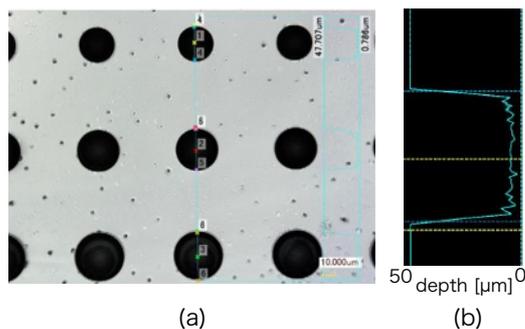


図4 培養ウェルの外観。(a) 上面図, (b) 断面図.

し、パリレン単独では細胞に対する親和性が低かったため、さらにフィブロネクチン(F-4759, SIGMA)のコーティングを施し、細胞が良好に基板上で伸展することを確認した。

(4) 培養ウェルは細胞伸展制御に有用である

作製した基板を用いて、異なる細胞密度で培養を行なった結果を図5に示す。(a)ではウェル内に伸展可能な領域が残っているが、細胞が仮足を伸ばし伸展しているのがわかる。(b)ではウェル内が細胞で満たされ、丸みを帯びて培養されている様子が確認できる。このことからウェル内の細胞数により細胞の伸展程度を制御することの可能性が示された。

ウェル内細胞数と細胞面積の関連を調べた結果を図6に示す。ウェル内細胞数の増加に伴い、細胞の伸展面積が減少する傾向が見られた。細胞数が3個のときの平均接着面積 $796 \pm 133 \mu\text{m}^2$ (n = 6)に対し、細胞数が8個の場合は $383 \pm 41 \mu\text{m}^2$ (n = 5)と接着面積は約半分となった。さらに、接着面積のばらつきも細胞数の増加とともに減少しており、より細かな制御が可能となる可能性が示された。これにより、開発したウェルは、細胞の接着面積の制御に有用と考えられた。

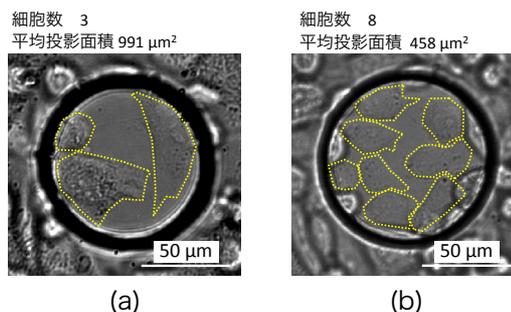


図5 培養ウェルを用いた細胞培養。(a) 細胞数3, 平均投影面積 $991 \mu\text{m}^2$, (b) 細胞数8, 平均投影面積 $458 \mu\text{m}^2$

(5) 培養ウェルはソノポレーションの基礎実験に利用できる

開発した培養ウェルを用いてソノポレーションを行った結果の1例を図7に示す。(a)において気泡が接着した細胞に(b)で蛍光が観察されたことから、膜損傷により細胞内にPIが導入されたことがわかる。(c)は破線で囲った細胞内のPIの蛍光輝度の時間変化を追った結果である。超音波照射直後に細胞内にPIの蛍光輝度が上昇し、約50秒後から輝度上昇が停止したことから、膜修復が行われたことがわかる。以上により、ウェル内の細胞に対してソノポレーションを実現できることを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. Endo S, Kudo N, Yamaguchi S, Sumiyoshi K, Motegi H, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K. Porphyrin derivatives mediated sonodynamic therapy on malignant gliomas in vitro. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 41: in print, 2015. (査読有)
2. Kudo N. Optical methods for visualization of ultrasound fields, *Japanese Journal of Applied Physics*. 54: in print, 2015. (査読有)
3. Kudo N. A simple technique for visualizing ultrasound fields without schlieren optics. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 41: in print., 2015. DOI 10.1016/j.ultrasmedbio. 2015.03.004 (査読有)
4. Kudo N and Kinoshita Y. Effects of cell culture scaffold stiffness on cell membrane damage induced by sonoporation. *Journal of Medical Ultrasonics* 41:411-420, 2014. (査読有)
5. 白幡 陽, 繁富香織, 工藤信樹, ソノポレーションにおける導入効率向上法検討のための微小培養ウェルの開発と評価, *電子情報通信学会技術研究報告*, 114(514):19-23, 2014.
6. 工藤祐也, 工藤信樹, パルス超音波を用いたソノポレーションにおける2気泡間相互作用を用いた細胞損傷の制御 *日本超音波医学会基礎技術研究会資料*. 2014(2):40-45, 2014.
7. 工藤 光, 工藤信樹, 培養足場層の硬さが微小気泡のふるまいとソノポレーション効果に与える影響, *日本超音波医学会基礎技術研究会資料*. 2014(3):22-25, 2014.
8. Sasaki N, Kudo N, Nakamura K, Lima SY, Murakami M, Kumara WRB, Tamura Y, Ohta H, Yamasaki M, Takiguchi M. Ultrasound image-guided therapy enhances antitumor effect of cisplatin, *Journal of Medical Ultrasonics*. 41(1):11-21, 2014. (査読有)
9. Kudo N, Tanaka Y, Uchida K, Basic studies on sonoporation with size- and position-controlled microbubbles adjacent to cells. *IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings*, 2013, 53-56, 2013. (査読有)

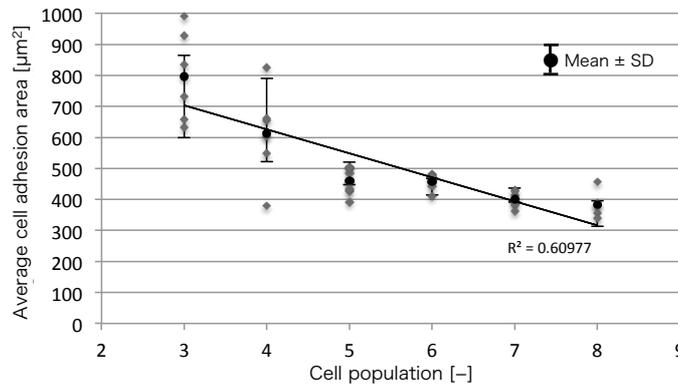


図6 培養ウェル内の細胞数と細胞1個あたりの平均接着面積の関係

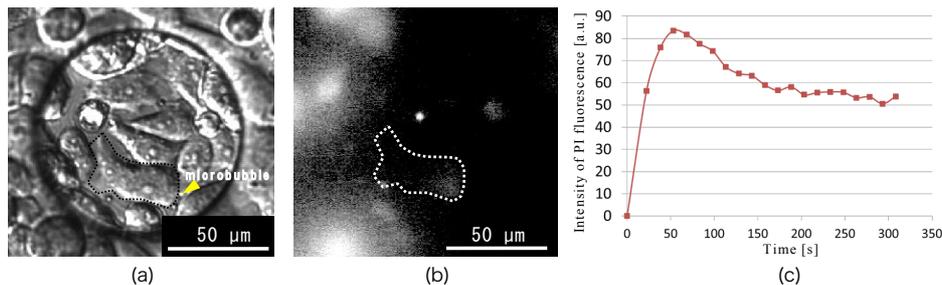


図7 ウェル内に培養した細胞のソノポレーション実験の一例。(a)細胞の微分干涉像。矢頭の位置の位置に細胞に付着した微小気泡が見える。(b)ソノポレーション後の同視野のPI蛍光像、点線で囲まれた細胞内でのPI蛍光が膜損傷の発生を表す。(c)細胞内のPI輝度積算値の時間変化。

10. Tanaka Y, Kudo N. Relation between cell membrane tension and repair of membrane damaged during sonoporation, IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings, 1777-1780, 2013. (査読有)
11. 内田和輝, 工藤信樹, [AI-2013-28/BT2013-27]微小気泡位置制御システムの開発と高速度撮影によるソノポレーション機序の検討, 日本超音波医学基礎技術研究会資料 2013(4):23-28, 2013.
12. 田中裕人, 工藤信樹:細胞の張力がソノポレーションにおける膜修復に与える影響, 日本超音波医学基礎技術研究会資料 2013(2):40-45, 2013.

[学会発表] (計17件)

1. Kudo N. Microbubbles and Sonoporation. The University of Hong Kong, Spring School Frontier Advances in Biomedical Ultrasound (invited lecture), 2015/04/29-30, The University of Hong Kong (Hong Kong)
2. 工藤信樹, 細胞培養足場層の硬さがソノポレーションにおける気泡と細胞のダイナミクスに与える影響, 平成26年度第4回超音波分子診断治療研究会, 2015/03/07, 福岡大学 (福岡市城南区)
3. 工藤祐也, 工藤信樹, ソノポレーションにおける2気泡間相互作用を用いた細胞損傷の制御, 第13回日本超音波治療研究会, 2014/11/15, 仙台情報・産業プラザ (仙台市青葉区)
4. 工藤 光, 工藤信樹, 細胞膜への微小気泡接着による細胞膜損傷率向上の可能性, 第13回日本超音波治療研究会, 2014/11/15, 仙台情報・産業プラザ (仙台市青葉区)
5. 工藤信樹, 光学的手法による超音波音場の可視化 (招待講演), 第35回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (招待講演), 2014/12/04, 明治大学 (東京千代田区)
6. 工藤信樹, 位置制御した気泡と細胞の相互作用の高速度観察, 日本ソノケミストリー学会第7回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム (招待講演), 2014/12/19, 横浜国立大学 (横浜市保土ヶ谷区)
7. 工藤信樹, 微小気泡捕捉機能を有する高速度顕微観察システムの開発, 平成25年度第4回超音波分子診断治療研究会, 2014/03/01, 福岡大学 (福岡市城南区)
8. 田中裕人, 工藤信樹, 細胞形状と流動性の変化がソノポレーションにおける細胞の損傷と修復に与える影響, 平成25年度第4回超音波分子診断治療研究会, 2014/03/01, 福岡大学 (福岡市城南区)
9. 工藤信樹, 画像差分シュリーレン法による超音波音場可視化, 平成25年度第3回超音波分子診断治療研究会 (招待講演), 2013/12/20, 滋賀医科大学 (大津市)

10. Kudo N, Tanaka Y, and Uchida K. Experimental system for sonoporation with size- and location-controlled microbubbles. International Conference on Biomedical Ultrasound (invited lecture), 2013/10/22-23, Taipei University (Taipei, Taiwan)
11. Kudo N. Effects of water surface conditions on standing wave fields generated inside a small chamber, Focused Ultrasound Therapy- Second European Symposium, 2013/10/10-11, Roma Eventi - Fontana di Trevi (Rome, Italy)
12. Kudo N. Cell damage and repair during sonoporation, Artimino Ultrasound Conference 2013, 2013/06/16-21, Windermere House, Lake Rosseau (Ontario, Canada)

[図書] (計2件)

1. 工藤信樹他, 南江堂, 乳腺ソナゾイド造影超音波診断ガイドブック. 2015, 印刷中.
2. 工藤信樹他, エヌ・ティー・エス, 微小気泡の最新技術. 2014, 55-61.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

受賞

1. 日本超音波医学会 菊池賞 (論文賞)
Kudo N and Kinoshita Y.
Effects of cell culture scaffold stiffness on cell membrane damage induced by sonoporation. Journal of Medical Ultrasonics 41:411-420 (2014)
2. 第13回日本超音波治療研究会奨励賞
工藤 光, 工藤信樹
細胞膜への微小気泡接着による細胞膜損傷率向上の可能性
3. 平成25年度電気・情報関係学会北海道支部連合大会優秀論文発表賞
白幡 陽, 工藤信樹
細胞膜張力制御のための微小培養容器の開発

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 信樹 (KUDO NOBUKI)
北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号: 30271638

(2) 研究分担者

繁富 香織 (SHIGETOMI KAORI)
北海道大学・大学院情報科学研究科・特任助教
研究者番号: 90431816